

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14557

研究課題名(和文)匂いで惹起される摂食行動の神経回路機構の解明

研究課題名(英文) Neuronal mechanisms for the odor induced eating behaviors in the olfactory cortex

研究代表者

眞部 寛之 (Manabe, Hiroyuki)

同志社大学・研究開発推進機構・准教授

研究者番号：80511386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、匂いで惹起される摂食行動の神経回路機構を明らかにすることで、これまでほとんど不明であった嗅皮質の機能に迫るものである。トレーシング実験等を行い、摂食中枢である視床下部外側部に直接投射する抑制性ニューロン集団が存在する新しい嗅皮質領域、ventral olfactory nucleusを発見した。また、電気生理学的手法を用いて、匂いで惹起される摂食行動中のventral Tenia Tectaニューロンの活動を調べたところ、各行動状態特異的に活動するニューロン群を発見した。

研究成果の概要(英文)：Central olfactory system translates odor information into motivated behaviors including appetitive food approach and eating behaviors. However, it is still unknown how the olfactory cortex controls eating-related behaviors in mammals. We performed retrograde tracing from the mouse lateral hypothalamus, and found that a group of inhibitory cells were clustered in a ventral region of the olfactory peduncle. We named this region as the ventral olfactory nucleus. To reveal a role of feeding-related behaviors of vTT, we recorded spike activities in the vTT during the eating-related behaviors. We found that vTT neurons respond to distinct behavioral states of feeding behavior. These results suggest that olfactory cortex has an important role for odor induced eating behaviors.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅覚 摂食行動 嗅皮質 Tenia Tecta

1. 研究開始当初の背景

動物にとって嗅覚は、食物の探索・識別、捕食者からの逃避、交尾相手の探索など生存のために必須の感覚である。嗅覚受容体の発見以後、嗅覚神経系の理解は急速に進歩し、嗅覚受容体を発現する嗅上皮や一次中枢である嗅球での情報処理の基本ロジックは明らかとなってきた。しかし、嗅球からの情報が統合される嗅覚二次中枢の嗅皮質における機能は依然不明である。

嗅皮質は、嗅球の投射ニューロンである僧帽・房飾細胞から直接入力を受ける領域として定義されている。げっ歯類において嗅皮質は、脳底部の大部分を占め、解剖学的に複数の亜領域に分類される。近年我々は、匂い入力が摂食行動を惹起させることに着目し、嗅覚入力を摂食行動に変換する神経回路を明らかにする研究を進めてきた。予備実験で、匂いで惹起される摂食行動に伴って応答する ventral Tenia Tecta (vTT) のニューロン群を発見した。vTT は、嗅球のすぐ尾側に位置し、数百マイクロメートル四方の小さい領域である。嗅皮質の一部であるため、嗅球から直接投射を受けることは知られているが、その他、投射先に関するわずかな情報があるのみで、機能は全く不明であった。しかし、匂いで惹起される摂食行動に伴って応答する vTT のニューロン群は、匂いの種類に依らず摂食行動に対応して応答することが分かり、vTT は匂い入力を摂食行動に変換する神経回路上で重要な役割をしている領域であると推察された。

vTT ニューロンは、摂食関連ペプチド含有ニューロンが多種存在する摂食中枢である外側視床下部 (lateral hypothalamus) に投射するとの報告がある (Price et al *J Comp Neurol* 1991)。また、一部のニューロンは視床下部外側部の orexin 神経に投射するとの報告がある (Sakurai et al *Neuron* 2005)。Orexin 神経は、覚醒や摂食行動を司る神経として注目されている。vTT ニューロンは嗅球の出力細胞から直接入力を受けることから、vTT から視床下部外側部までの回路を使うと、匂い情報は最短3シナプスしか介さずに視床下部領域まで到達することになり、この回路は、匂い情報がよりダイレクトに摂食行動へと影響を与える回路であると考えられる。

2. 研究の目的

vTT を中心として、匂いで惹起される摂食行動の神経回路機構を明らかにする。特に、vTT から視床下部外側部に直接投射するニューロンを同定し、匂いで惹起される摂食行動時の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 解剖学的解析

逆行性トレーサーを用いた解析
視床下部外側部に直接投射する嗅皮質領

域を同定するため、軸索末端から逆行的にニューロンに取り込まれるトレーサーである、コレラトキシンサブユニット B (CTB-Alexa555) を視床下部外側部に投与した。

視床下部外側部への投射部位の検証

視床下部外側部に直接投射する嗅皮質ニューロンが、視床下部外側部内のどこに出力しているのかを確かめた。視床下部外側部に Cre 組換え酵素を搭載した逆行性レンチウイルス (FuG-E MSCV-nCre) を注入し、嗅皮質に Cre 存在下チャンネルロドプシンと蛍光タンパクである EYFP が結合したタンパク質を発現する、アデノ随伴ウイルス (AAV2-hSyn-DIO-ChR2-EYFP) を注入した。注入1週間後灌流固定し、脳切片を作成、EYFP と摂食関連ペプチドであるオレキシン (Orexin) とメラニン凝集ホルモン (MCH) の蛍光抗体染色を行うことで、これら摂食関連ペプチド分泌ニューロンの存在部位に、嗅皮質ニューロンの軸索が到達しているかどうかを確かめた。

視床下部外側部に直接投射する嗅皮質ニューロンの細胞種の特異性

視床下部外側部へ直接投射する嗅皮質ニューロンが興奮性なのか、抑制性なのかを確かめるために、興奮性ニューロンのマーカーである VGluT1 および、抑制性ニューロンのマーカーである GAD65/67 の in situ ハイブリダイゼーションと逆行性トレーシング、抗体染色を組み合わせた多重蛍光標識を行った。

視床下部外側部に直接投射する嗅皮質ニューロンが入力を受ける領域の同定

本研究によって、視床下部外側部に直接投射する新規嗅皮質領域を発見した (後述)。この新規領域は解剖学的に未分類であり、解剖学的性質が未知なため、嗅球から直接入力を受ける嗅皮質領域に分類できるのかどうか不明であった。当該領域が嗅球から直接入力を受けるかどうか、遺伝子改変狂犬病ウイルスを用いた TRIO (Tracing the relationship between input and output) 法を用いて確かめた。この手法は、狂犬病ウイルスがシナプスを逆行的に飛び越えて上流のニューロンに感染することを利用する方法で、4種類のウイルスを組み合わせることで、目的のニューロンの1つ上流のニューロンを同定できる方法である。視床下部外側部に Cre 組換え酵素を搭載した逆行性レンチウイルス (FuG-E MSCV-nCre) を注入し、当該嗅皮質候補領域に改変型狂犬病ウイルス受容体 TVA (AAV2-CAG-Flex-TVA-mCherry) および狂犬病ウイルス増殖に必要な rabies glycoprotein を搭載した Cre 依存型アデノ随伴ウイルス (AAV2-CAG-Flex-rabiesG) を注入した。2週間後、エンベロープを EnvA に偽型し、増殖遺伝子 G を欠損し、代わりに EGFP

を搭載した改変型狂犬病ウイルス (SAD-dG-EGFP+EnvA) を同一候補領域に注入した。1週間後、還流固定し、脳切片を作成し、EGFP、TVA-mCherry、DARPP32、またはEGFP、OCAMの多重免疫染色を行った。また、同様の手法を用いて、嗅球以外のどの脳領域から直接入力を受けるのかについても検証した。

(2) 行動課題

匂いを手掛かりとした摂食行動課題

匂いで惹起される摂食行動を観察するために、以下の行動実験系を確立した。特定の匂いを付けたディッシュに砂糖を置き、床敷きで砂糖を隠したものをマウスに提示した。最初は警戒するが、学習が進むと床敷きを掘って砂糖を食べるようになった。また、特定の匂いと砂糖との連合学習後、塩化リチウムを腹腔内に注射することでマウスに体調不良を起こさせると、その匂いを付けたディッシュ上の砂糖を食べなくなった。このような学習によって、摂食、もしくは嫌悪と関連付けた匂いを数種類用意した(摂食: オイゲノール、バナラエッセンス、嫌悪: アーモンドオイル)。これらの匂いを付けたディッシュに砂糖とそれを隠す床敷きを入れ、ランダムに提示した。マウスはディッシュに近づき、砂糖と連合している匂いならば摂食行動を起こし、塩化リチウムによって嫌悪と連合された匂いならば、摂食を拒否しその場から立ち去るようになった。

匂いを手掛かりとした Go/No-go 学習課題

匂いで惹起される摂食(摂水)行動を詳細に解析するため、各行動状態を細分化できる匂いを手掛かりとした Go/No-go 学習行動課題を用いた。匂いが出る匂いポートと報酬(水)が得られる水ポートの2つが壁に設置されているオペラントボックスを用いた。マウスが匂いポートに鼻を突っ込み、匂いAが出てくれば水ポートに行けば(Go)水がもらえ、匂いBが出てくれば水ポートに行かず一定時間待つ(No-Go)という行動を学習させた。タスクはコンピューター制御し、試行毎にランダムな匂いが出現するようにした。各ポートへの出入りはポートに付けた赤外線センサーを用いてモニターした。

(3) 電気生理学的解析

直径 12.5 μ m のタングステンまたはニクロムワイヤー4本を1つにしたテトロード電極を4本搭載したマイクロドライブ(テトロード電極を動かして様々な細胞からニューロン発火活動を記録するための装置)を自作した。麻酔下でマイクロドライブを頭蓋骨に設置する手術を行った。手術から回復後、上記行動課題中マウス嗅皮質から神経活動を記録した。記録システムはNeuralynx社製またはOpenEphysシステムを用いた。マウスの行動をカメラにて記録すると共に、(2)-では、タスクの進行やポートへの出入りなどの

情報をこれら記録システムに入力することで、ニューロン発火活動記録と動物の行動を同期させた。

(4) 光遺伝学的手法と電気生理学的手法を用いた、in vivoでの特定細胞の同定とその電気生理学的特性の解析

光遺伝学的手法を用いた、対象ニューロンのラベリング

光刺激で細胞を脱分極させることのできるチャンネルロドプシン(ChR2)を対象細胞特異的に発現させた。視床下部外側部に逆行性に感染しCreを発現させるアデノ随伴ウイルス(AAV-CMV-GFP-Cre)を注入した。該当嗅皮質領域に、Cre依存的でニューロン特異的に発現するプロモーター下にChR2と確認用蛍光タンパクを発現するアデノ随伴ウイルス(AAV2-hSyn-DIO-ChR2-mCherry)を投与した。

in vivoで目的細胞からのニューロン発火活動の記録

(4)で使用したマイクロドライブを改良し、テトロード電極と光ファイバーを同一脳領域に設置できるようにした。このマイクロドライブを用い、(2)の行動課題を行わせ、ニューロン発火活動を記録した。記録後、設置した光ファイバーより光を当て、記録細胞の中から活動電位を出すニューロンを特定した。当該ニューロンはChR2を発現しているニューロンであり、視床下部外側部に直接投射するニューロンであることが判明するため、当該ニューロンの性質を明らかにすることができる。

4. 研究成果

本研究では、大きく2つの研究結果を得た。

- ・視床下部外側部に直接投射する新規嗅皮質領域を発見した。
- ・摂食行動中(報酬獲得行動中)の各行動状態特異的に応答するvTTニューロンを発見した。

(1) 解剖学的解析

逆行性トレーサーを用いた解析

視床下部外側部に直接投射する嗅皮質領域を明らかにするために、CTB-Alexa555を視床下部外側部に注入し、1週間待ったのち灌流固定、20 μ m厚の冠状断切片を作成した。その結果、嗅皮質の最もrostral部(嗅球の直後)、前嗅核下部、ventral Tenia Tecta(vTT)と前梨状皮質に挟まれた領域のニューロン群が染色された(図1、黄丸部分)。嗅結節の直上にあるため、線条体の一部の可能性があり、これを確かめるために線条体のマーカーであるDARPP32の免疫染色を同時に行ったが陰性であった。この領域はこれまでに報告がなく、解剖学的に未分類の領域であった。そこで、新しい嗅皮質亜領域として、

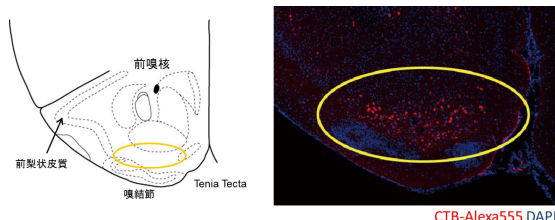


図1: VON (黄丸)

Ventral Olfactory Nucleus (VON)と名付けた。当初予想されていたvTTには、CTBのシグナルがほぼ見られなかった。VONはvTTのすぐ隣に位置しており、詳細な解析を行わないと判別が難しいこと、VONはこれまで解剖学的に未分類であったことから、これまでの報告では、vTTから視床下部外側部に投射していると考えられたものと推察される。

視床下部外側部への投射部位の検証

VONニューロンの軸索は、orexinニューロン、MCHニューロン近傍に達していることが分かった。実際にこれらのニューロンとコンタクトしているかどうかは、電子顕微鏡による解析等、さらなる解析が必要であるが、本研究でも実際にコンタクトしていると思われる像が確認されており、VONとこれら摂食関連ペプチド含有ニューロンが作る回路が、嗅覚入力から最短経路で摂食行動を惹起する回路である可能性がある。

視床下部外側部に直接投射する嗅皮質ニューロンの細胞種の特定

VONニューロンはほぼVGluT1陰性であった。前嗅核やvTT、前梨状皮質ニューロンは陽性のものが多かった。GAD65/67は前嗅核とVONのニューロンが陽性であった。VON内、CTB-Alexa555陽性ニューロンの約半数がGAD65/67陽性であり、視床下部に直接投射するVONニューロンの多くが抑制性ニューロンであることが分かった。

視床下部外側部に直接投射する嗅皮質ニューロンが入力を受ける領域の同定

VONニューロンに狂犬病ウイルスが感染したスターター細胞が作られ、嗅球の僧帽細胞がEGFP陽性となったことから、嗅球の僧帽細胞から視床下部外側部に直接投射するVONニューロンへ直接投射していることが明らかとなった。また、前嗅核、梨状皮質などの他の嗅皮質領域から直接入力を受けることが分かった。さらに、前頭眼窩皮質からも直接入力を受けることが分かった。

(2) 行動課題

匂いを手掛かりとした摂食行動課題

マウスは1~2週間ほどでこの課題をこなすようになり、正答率はほぼ100%であった。この状態でマウスを手術し、行動中の嗅皮質領域からのニューロン発火活動の記録を行った。記録時、マウスにこの課題を1日に60試行行わせた。

匂いを手掛かりとしたGo/No-go学習課題
マウスは1~2週間ほどで正答率90%以上に達した。この状態でマウスを手術し、行動中の嗅皮質領域からニューロン発火活動の記録を行った。ニューロン活動の解析は、1日200試行以上行ったものを使用した。

(3) 電気生理学的解析

匂いを手掛かりとした摂食行動中のマウスvTTの応答

匂いを手掛かりとした摂食行動中のvTTからニューロン発火活動を記録した(432ニューロン/6マウス)。vTTの多くのニューロンが摂食行動中に発火した(図2、摂食ニューロン)。これらのニューロンは匂いの種類に関係なく応答するものが多かった。また、比較実験として砂糖の代わりに普段マウスが食べている粉餌を与えた試行においても砂糖と同様に発火した。

当該課題では、ディッシュに十分な砂糖ならびに粉餌が入っているので、ディッシュはマウスがまだ摂食中に強制的に取り除かれた。この時、マウスの口腔内に砂糖や粉餌が残っているにも関わらず、摂食ニューロンの応答はすぐに低下した。これらの応答変化は、vTTの摂食ニューロンが、匂いや味に対して応答するというよりは摂食行動自体に対して応答することを示唆する。

vTTでは、摂食ニューロンの他、ディッシュに近づく際に応答し、摂食中に応答が下がる探索ニューロンも数多く記録された(図2、探索ニューロン)。

摂食ニューロンも探索ニューロンも、動物の行動と厳密に相関しており、vTTのニューロンは、動物の行動状態に対応して応答していると考えられる。

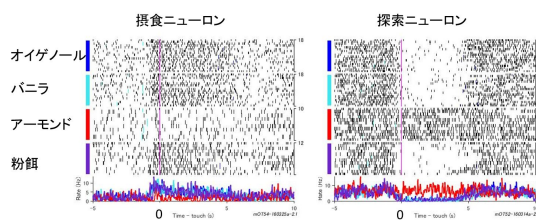


図2: 摂食ニューロンと探索ニューロン: ディッシュにタッチした時間を0秒とした

匂いを手掛かりとしたGo/No-go学習課題中のvTTニューロンの応答

課題中のマウスvTTから346個(6匹)のニューロン発火活動を記録した。これらのニューロンの多くが、匂いポートに鼻を突っ込む行動や、匂いを嗅ぐ行動、報酬ポートに移動する行動、報酬ポートに鼻を突っ込む行動、報酬を待つ行動、報酬を得る行動など、各行動に特異的に応答した(図3)。本行動課題は、匂いを手掛かりとした摂食(報酬)獲得行動を、さらに詳細な行動状態に分類することができる。その結果、それぞれの行動状態に対応したニューロン群がvTTで見つかったことで、vTTは、一連の報酬獲得行動の各行

動状態に対応するニューロンが存在することが分かった。

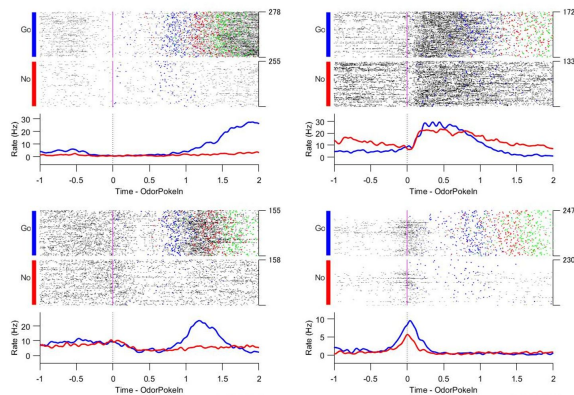


図3:様々な行動状態特異的に応答するVONニューロン

解剖学的にvTTは、他の嗅皮質領域と密に相互連絡をしているばかりでなく、腹側前頭前野など、前頭葉からの直接入力を受ける領域である。一連の報酬獲得行動に対応したvTTニューロンの応答は前頭葉のtop-down入力によって惹起されるものと推定される。また、嗅球から外界の匂い情報が入力される。すなわちvTTは、外界の匂い入力とtop-down入力のcoincidence detectorになっていると推定される。これまで、嗅皮質の情報表現については不明な点が多く、嗅覚研究者にとって大きな課題であった。特にこれまでは、外界の匂い情報が嗅皮質でどのように表現されるかに注目が集まっており、top-down入力の関与に関してはあまり議論されてこなかった。本研究結果から、特定の行動状態では特定のニューロンにtop-down入力があると推定され、top-down入力と外界の匂い入力との組み合わせが適切な情報処理に必要であるという新しい仮説を打ち立てることができた。

(4) 光遺伝学的手法と電気生理学的手法を用いた、in vivoでの特定細胞の同定とその電気生理学的特性の解析

光遺伝学的手法を用いた、対象ニューロンのラベリング

視床下部外側部に逆行性にCreを発現させるアデノ随伴ウイルスを、VONにCre存在下でChR2を発現させるアデノ随伴ウイルスを投与した。2週間後に還流固定し、冠状断切片を作成したところ、VONニューロンにChR2が発現していることが確認できた。

in vivoで目的細胞からのニューロン発火活動の記録

匂いを手掛かりとした行動中のVON領域からニューロン発火活動を記録することには成功した。しかし、VON領域は非常に狭く、対象となるChR2発現細胞が非常に少ないため、光刺激でVONから直接視床下部外側部に到達するニューロンと同定できたニューロンから発火活動を記録するには至っていない。

い。現在、研究を継続遂行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計6件)

村田航志、小林憲太、深澤有吾、山口正洋、森憲作、眞部寛之、視床下部外側野に投射する嗅皮質領域の発見、第2回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会、2017年

塩谷和基、廣川純也、櫻井芳雄、森憲作、眞部寛之、匂いに基づく摂食行動決定時、摂食中における腹側テニアテクタニューロンの活動、第40回日本神経科学大会、2017年

Activity pattern of olfactory cortex neurons during odor-reward association tasks and reverse learning、谷隅勇太、廣川純也、櫻井芳雄、森憲作、眞部寛之、第40回日本神経科学大会、2017年

村田航志、小林憲太、深澤有吾、山口正洋、森憲作、眞部寛之、Identification of a novel subregion of the olfactory cortex projecting to the lateral hypothalamus in mice、第40回日本神経科学大会、2017年

木下智貴、村田航志、小林憲太、深澤有吾、山口正洋、森憲作、眞部寛之、視床下部外側野に投射するマウス嗅皮質領域の発見、日本解剖学会第77会中部支部学術集會、2017年

塩谷和基、村田航志、廣川純也、森憲作、櫻井芳雄、眞部寛之、匂いで惹起された摂食行動時に応答する腹側テニアテクタの神経活動、次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム2017、2017年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞部 寛之 (MANABE, Hiroyuki)

同志社大学研究開発推進機構 准教授

研究者番号: 80511386